

福井大学平成22年度重点研究「競争的配分経費(若手研究者支援)」 日本海の水産資源を利用した、細胞培養の新しい技術

研究代表者： 寺田 聡（工学研究科・准教授）
共同研究者： 柳原 佳奈（産学官連携本部・研究員）、
佐久間 紹子（工学研究科・特命助教）

概 要	
	再生医療に用いられる幹細胞の培養では、細胞の足場が重要である。現行の足場としての培養基材には、哺乳類由来因子が多く用いられている。しかしながら、これら因子はコスト高で人畜共通感染症の懸念があるため安全性に乏しい。そこで、哺乳類由来因子の代替としてクラゲコラーゲンに着目した。クラゲよりタンパク質を抽出し、コラーゲンを得た。このクラゲコラーゲン上で骨髄由来の間葉系幹細胞を培養した。クラゲコラーゲン上では間葉系幹細胞の増殖が有意に促進されていた。さらに、骨細胞へ分化誘導を行ったところ、細胞の骨分化マーカー遺伝子発現が上昇し、さらにアリザリン染色で強く染まり、骨分化が促進されていた。そして、その骨分化レベルはブタコラーゲン上より高かった。このように、クラゲコラーゲンはより高機能な足場となりうる。
関連キーワード	間葉系幹細胞、コラーゲン、クラゲ、骨分化、足場

研究の背景および目的

近年、日本海域ではエチゼンクラゲやミズクラゲが大量発生し、漁業や発電所など多くの産業に多大な損失を及ぼしている。エチゼンクラゲは秋冬に日本海に到達、漁網を破るなど甚大な被害を与える。ミズクラゲは原子力・火力発電所の廃熱で大量発生し、冷却水取水口を塞ぐために駆除が求められている。本研究では、これら公害となっているクラゲを有効利用すべく、クラゲに含まれるコラーゲンに着目し、細胞治療・再生医療への応用をめざす。

再生医療の産業規模は近い将来、世界市場で10兆円超にのぼるといわれている。とくに、幹細胞を利用した細胞治療に期待が集まっている。現在のところ、幹細胞を利用しようという検討は、昨年に米国でヒト胚性幹細胞(ES細胞)の臨床試験が始まるなど、急速に研究の臨床応用および商品化が加速している。

このように細胞そのものの理解が深まりつつある一方で、これら幹細胞を培養する周辺技術には問題が山積している。すなわち、「培地」および「細胞の足場基材」、「細胞の凍結保存技術」が不可欠

なのだが、これらに用いられる成分として、哺乳動物由来因子が利用されているのが実状である。哺乳動物由来因子は、細胞に対する効果は高いものの、コスト高で人畜共通感染症の懸念がある。臨床応用を考慮した場合、調製した細胞を人体に投与するのであるから、哺乳類由来因子は培養プロセスから一切除外されねばならない。

そこで本研究では「細胞の足場素材」に関して、哺乳動物由来因子の代替として、クラゲ由来のコラーゲンに着目した。クラゲコラーゲンは、ヒトとは生物種が遠いため感染症の懸念が少なく、さらにクラゲそのものが駆除されるべき有害生物であるため有効である。

社会的・経済的観点からは、クラゲを利用した新しい産業を興し、原子力発電所や漁業にとっては天敵であったクラゲから開放されることになる。特に発電所での廃熱を利用することで、「クラゲの栽培漁業」が成立することとなる。さらに、再生医療や細胞治療の材料として、感染源とならず安定的にかつ安価に供給されるものが提供される。このように、幅広い波及効果が期待される。

研究の内容および成果

細胞治療によく用いられる細胞として、間葉系幹細胞がある。この幹細胞は自家移植が可能であり、ES細胞のように倫理的な問題がない。また、比較的分化も進んでいることから目的細胞への誘導も容易である。そのため、もっとも臨床応用に近い細胞として期待されている。そこで、ラットの間葉系幹細胞を対象に、クラゲコラーゲンの効果を検討した。

1. 間葉系幹細胞の増殖に対する効果

実際に治療を行う場合、間葉系幹細胞の培養には2つの段階がある。すなわち、細胞を必要数まで増幅させる段階と、増幅させた細胞を骨や軟骨など様々な細胞へ分化誘導する段階である。

本検討では、まず幹細胞の増殖に対するクラゲコラーゲンの効果を検討した。クラゲコラーゲン

を培養皿にコートし培養したところ、コートしない場合よりも幹細胞の増殖が促進されていた。さらに、増幅後でも分化能を維持していた。

このように幹細胞の増幅過程においてクラゲコラーゲンの有効性を見出した。

2. 間葉系幹細胞の骨分化に対する効果

間葉系幹細胞の分化過程に対するクラゲコラーゲンの効果を検討するために、骨分化に対する効果を検討した。骨分化培地を用いて、クラゲコラーゲン上で間葉系幹細胞を培養したところ、細胞の石灰化が促進された。

次に、骨分化マーカーの発現について解析したところ、クラゲコラーゲン上ではブタコラーゲン上に比べて、前期マーカー遺伝子の発現が高かった。さらに中期マーカー遺伝子および後期マーカー遺伝子の発現がクラゲコラーゲン上ではブタコラーゲン上よりも早い時期に上昇していることを見出した。これらのことから、幹細胞の分化過程において、クラゲコラーゲンは単に哺乳類由来因子の代替のみならず、より早期に分化を誘導できる高機能な足場として期待できる。

3. ES 細胞培養に対する効果

ES 細胞を対象に検討した。上で効果のあったクラゲコラーゲン上でマウス ES 細胞を培養した。培地には、われわれが開発したアニマルフリー培地「セリシン GIT 培地」を用いた。これにより、ほ乳類由来因子を全く含まない培養によって、ES 細胞を増幅した。このようにして増幅された ES 細胞は、分化能を保持していることがリアルタイム PCR 法による遺伝子解析で見いだされた。すなわち、ES 細胞のアニマルフリー環境の下での増幅に成功した。

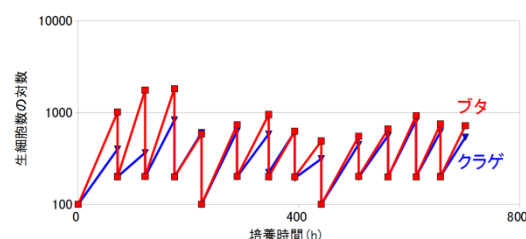


図1 GIT 培地を用いた ES 細胞の増幅
(ブタとクラゲコラーゲンの比較)

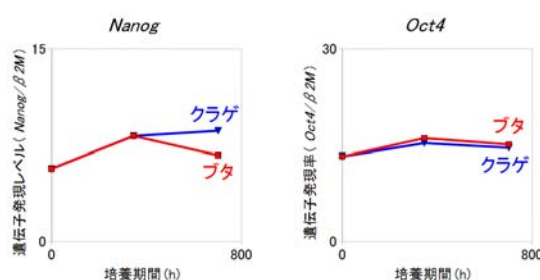


図2 未分化マーカーの発現
(ブタとクラゲコラーゲンの比較)

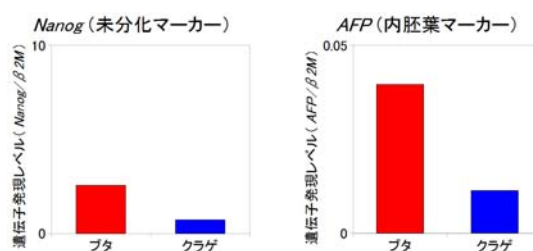


図3 分化マーカーの発現
(ブタとクラゲコラーゲンの比較)

本助成による主な発表論文等、特記事項および 競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

国際学会発表 2件

Application of jellyfish collagen to the scaffold of MS cells; ESACT2011, May 2011, Vienne, Austria

Culture of mouse ES cells using mammalian component-free medium 'SERICIN-GIT', JAACT2010, Sep. 2010, Sapporo

国内学会発表 5件

(再生医療学会、農芸化学会、化学工学会、生物工学会、マリンバイオテクノロジー学会)

「特記事項」

(1) 受賞1件

分担者の柳原佳奈が研究奨励賞を受賞(2010年7月、セルプロセッシング計測評価研究部会)。

(2) シンポジウムの主催 2件

"Novel culture supplement for mammalian cell culture" September, 2010, Sapporo

「抗体医薬を支える動物細胞培養技術 生物工学が主導するこれからの医薬開発」2007年9月広島(日本生物工学会2007年度大会期間中の開催)

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

柳原研究員が平成23年度の農水省の大型予算「イノベーション創出基盤的研究推進事業」に、「再生医療のためのクラゲ由来因子からなる高効率な培養基材」を応募した(申請9千万円)。